

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

17.01.03

16 JUL 2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日

Date of Application:

2002年 1月17日

REC'D 14 MAR 2003

V. PO

PCT

出願番号

Application Number:

特願2002-008435

[ST.10/C]:

[JP2002-008435]

出願人

Applicant(s):

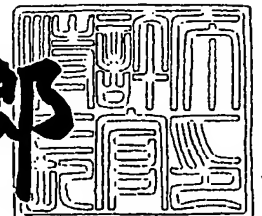
田辺製薬株式会社

PRIORITY
DOCUMENTSUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 2月25日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



BEST AVAILABLE COPY

出証番号 出証特2003-3010132

【書類名】 特許願
 【整理番号】 A00-4783
 【あて先】 特許庁長官殿
 【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県芦屋市西山町 1 7 - 1 0 - 1 1 3
 【氏名】 今井 祐二

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府摂津市千里丘 4 - 1 1 - 5 - 5 0 3
 【氏名】 脇本 公嗣

【発明者】

【住所又は居所】 京都府宇治市槇島町一ノ坪 3 4 4 - 2 - 4 0 1
 【氏名】 千葉 博昭

【特許出願人】

【識別番号】 000002956
 【氏名又は名称】 田辺製薬株式会社

【代理人】

【識別番号】 100076923
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 箕浦 繁夫
 【電話番号】 06-6300-2726

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 016322
 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1
 【包括委任状番号】 9707174

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規ホスホリパーゼ A₂ 及びその遺伝子

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 以下の (a)、(b) 及び (c) から選択されるタンパク質。

(a) 配列番号 9 で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

(b) 配列番号 9 で示されるアミノ酸配列において 1 若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつホスホリパーゼ A₂ 活性を有するタンパク質。

(c) 配列番号 8 で示される塩基配列と相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件下でハイブリダイズする DNA にコードされ、かつホスホリパーゼ A₂ 活性を有するタンパク質。

【請求項 2】 ヒト由来である、請求項 1 記載のタンパク質。

【請求項 3】 請求項 1 記載のタンパク質をコードする遺伝子。

【請求項 4】 以下の (a) 又は (b) の DNA からなる遺伝子。

(a) 配列番号 8 で示される塩基配列からなる DNA。

(b) 配列番号 8 で示される塩基配列と相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつホスホリパーゼ A₂ 活性を有するタンパク質をコードする DNA。

【請求項 5】 ヒト由来である、請求項 4 記載の遺伝子。

【請求項 6】 請求項 3 又は 4 記載の遺伝子を含む組換えベクター。

【請求項 7】 発現ベクターである、請求項 6 記載の組換えベクター。

【請求項 8】 請求項 7 記載の組換えベクターが導入された宿主細胞。

【請求項 9】 請求項 1 記載のタンパク質を認識する抗体。

【請求項 10】 請求項 1 記載のタンパク質、グリセロリン脂質及び被験物質を含む系内で酵素反応を行う工程と、請求項 1 記載のタンパク質の酵素活性に対する被験物質の阻害作用を検定する工程を含む、ホスホリパーゼ A₂ 阻害剤を特徴付け、同定又は選択するための方法。

【請求項 11】 請求項 1 記載のタンパク質及び被験物質を含む系内で結合反応を行う工程と、被験物質が請求項 1 記載のタンパク質との結合能を有するか否か

を検定する工程を含む、ホスホリパーゼ A₂ 阻害剤を特徴付け、同定又は選択するための方法。

【請求項 12】複数の型のホスホリパーゼ A₂ に対する阻害作用の選択性によって特徴付け、同定又は選択するために使用される、請求項 10 又は 11 記載の方法。

【請求項 13】ヒト又は非ヒト動物個体から採取した生体試料について、請求項 3 又は 4 記載の遺伝子の発現レベルを検定することを特徴とする、乾癬の検査方法。

【請求項 14】配列番号 8 で示される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸又はその相補物をプローブ又はプライマーとして用いて検定を行う、請求項 13 記載の検査方法。

【請求項 15】配列番号 4 で示される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸又はその相補物をプローブ又はプライマーとして用いて検定を行う、請求項 13 記載の検査方法。

【請求項 16】請求項 1 記載のタンパク質を認識する抗体を用いて検定を行う、請求項 13 記載の検査方法。

【請求項 17】請求項 1 記載のタンパク質を認識する抗体を用いて、請求項 1 記載のタンパク質の細胞中又は組織中での発現を検出する方法。

【請求項 18】配列番号 8 で示される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸又はその相補物をプローブ又はプライマーとして用いて、請求項 3 又は 4 記載の遺伝子を検出する方法。

【請求項 19】請求項 3 又は 4 記載の遺伝子の細胞中での発現を抑制するために使用される、配列番号 8 で示される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸又はその相補物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、乾癬に関連する、新規なホスホリパーゼ A₂ 及びその遺伝子に関する。

【0002】

【従来の技術】

乾癬 (psoriasis) は、炎症性角化症候群の一つであり、鱗屑を特徴とする慢性難治性皮膚疾患である。多くの場合、軽快憎悪を繰り返し、現在まで決定的な治療方法はない。

【0003】

乾癬はその病態の特徴から、(1) 尋常性乾癬、(2) 乾癬性紅皮症、(3) 関節症性乾癬、(4) 滴状乾癬、(5) 膿疱性乾癬の5型に大別される。このうち、尋常性乾癬は患者数が最も多く約8割を占め、膿疱性乾癬は、全身症状を伴い時として死に到る。いずれの型においても乾癬の病態には、表皮及び真皮内の免疫学的異常と、表皮角化細胞の増殖・分化異常の両者が伴う(相場節也、尋常性乾癬の病因・病態 免疫学的側面、MB Derma、第2巻、第15-21頁、1997年；清島真理子、尋常性乾癬の病因・表皮細胞の増殖・分化機構、MB Derma、第2巻、第23-30頁、1997年)。

【0004】

乾癬の発症原因には、遺伝的背景と外的因子の両方が関与しており、ある種の遺伝学的背景を有する人に、何らかの外的又は内的因子が加わって発症する。

【0005】

乾癬については、古くから疫学的調査が行われ、その遺伝形態は多因子性であることが知られている。親子間での発生率から乾癬は優生遺伝の形式をとると推定されており、また、双生児間の一致率から、発症に関与する遺伝子数はさほど多くないと考えられている(五十嵐敦之、尋常性乾癬の疫学、MB Derma、第2巻、第1-5頁、1997年；小沢明、尋常性乾癬の遺伝、MB Derma、第2巻、第7-13頁、1997年)。

【0006】

第6染色体のHLA抗原遺伝子領域に存在するPSOR1 (Psoriasis susceptibility) 遺伝子は、腎移植時のHLAのタイピングから偶然に発見された乾癬感受性遺伝子である。乾癬の発症に関与する遺伝子としては、このPSOR1遺伝子のほか、第16、17、20染色体に位置する数種類の遺伝子が現在までに報告され

ている。(大城戸宗男、乾癬とその感受性遺伝子、日皮会誌、第105巻、第1505-1510頁、1995年)

しかし、乾癬の発症メカニズムは未だ不明な点が多く、治療方法の開発などは難しい状況にある。新たな診断方法及び治療方法の開発に繋げるため、乾癬の発症に関与する遺伝子(乾癬関連遺伝子)の探索と解析の進展が望まれている。

【0007】

一方、乾癬等の炎症性疾患に深く関与する酵素として、ホスホリパーゼA₂が知られている。ホスホリパーゼA₂は、グリセロリン脂質の2位のエステル結合を加水分解して等モル量の遊離脂肪酸とリゾリン脂質を産する反応を触媒する酵素である。生体膜を構成するグリセロリン脂質からホスホリパーゼA₂の作用によって遊離したアラキドン酸は、リポキシゲナーゼ等によってロイコトリエン類に変換され、又はシクロオキシゲナーゼ等によってプロスタグランジン類に変換され、若しくはこれに更にトロンボキサンシンターゼが作用してトロンボキサンA₂等に変換される。これらのエイコサノイド(ロイコトリエン類、プロスタグランジン類、トロンボキサン類)は、種々の炎症、アレルギー反応、虚血性疾患等に密接に関与していることが明らかとなっており、ホスホリパーゼA₂は、アラキドン酸以降の炎症性メディエーター産生につながる最初の反応を惹起する酵素として重要な役割を果たしている。

【0008】

ホスホリパーゼA₂には、少なくとも17種類の分子種があることが知られており、それらは構造及び性質の類似性から4つのサブクラス(分泌性ホスホリパーゼA₂、細胞質ホスホリパーゼA₂、Ca²⁺非依存的ホスホリパーゼA₂、血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ)に分類されている。

【0009】

このうち、細胞質ホスホリパーゼA₂(cPLA₂)は、細胞質局在性の高分子量ホスホリパーゼA₂であり、これまでに3種の分子種(cPLA₂α、cPLA₂β、cPLA₂γ)が同定されている。cPLA₂γはCa²⁺濃度に非依存的に活性を発揮するのに対し、cPLA₂α及びcPLA₂βは、蛋白分子のN末端側にリン脂質結合領域を有し、Ca²⁺濃度依存的にリン脂質膜に結合して

活性を発揮するが、その Ca^{2+} 必要量は μM オーダーであるため、細胞質内でも作用を発揮すると考えられている。

【0010】

ホスホリパーゼ A_2 は、炎症性疾患治療薬等の開発研究において重要な標的分子であり、その阻害剤の研究が精力的に進められている。既知医薬の中にホスホリパーゼ A_2 阻害作用が見出されたものがあり、また、特異的なホスホリパーゼ A_2 阻害剤が有用な治療薬となりうるが見出されている。

【0011】

治療効果が高く、副作用の少ない優れた医薬を開発するためには、標的とするある型のホスホリパーゼ A_2 に対して選択性の高い阻害剤を選択することが望まれている。

【0012】

さらに、従来のものとは異なる分子種である新しい型のホスホリパーゼ A_2 を見出すことが、炎症性疾患の発症メカニズムの研究のためにも、また、新たな治療薬の標的分子となる可能性からも、望まれている。

【0013】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、乾癬に関連する、新規な型のホスホリパーゼ A_2 及びその遺伝子を提供することにある。また、ホスホリパーゼ A_2 阻害剤の特徴付け、同定又は選択を行うための新しい方法、及び、乾癬の診断や検査の新しい方法を提供することにある。また、上記以外の目的については以下の記載により明らかである。

【0014】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、大久保らの開発したボディー・マップ法 (Methods in Molecular Genetics、第5巻、第17-33頁、1994年) を用いて、乾癬患者と正常人の表皮で発現している遺伝子を鋭意比較研究することにより、乾癬患者の表皮で特異的に発現が増大している乾癬関連遺伝子 (GS21015遺伝子) を見出した。さらに、当該遺伝子にコードされるタンパク質が新規なホスホリパーゼ A_2 である

ことを見出し、当該ホスホリパーゼ A₂ を遺伝子組換え技術によって細胞中で発現させることに成功して、本発明を完成するに至った。

【 0 0 1 5 】

すなわち、本発明は、以下の (a)、(b) 及び (c) から選択されるタンパク質である。

(a) 配列番号 9 で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

(b) 配列番号 9 で示されるアミノ酸配列において 1 若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつホスホリパーゼ A₂ 活性を有するタンパク質。

(c) 配列番号 8 で示される塩基配列と相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件下でハイブリダイズする DNA にコードされ、かつホスホリパーゼ A₂ 活性を有するタンパク質。

【 0 0 1 6 】

また、本発明は、前記タンパク質をコードする遺伝子、並びに、当該遺伝子を含む組換えベクター及び宿主細胞である。また、前記タンパク質を認識する抗体である。

【 0 0 1 7 】

さらに、本発明は、前記タンパク質を用いて、ホスホリパーゼ A₂ 阻害剤を特徴付け、同定又は選択するための方法である。また、前記タンパク質をコードする遺伝子の発現レベルを検定することを特徴とする、乾癬の検査方法である。

【 0 0 1 8 】

後記配列表の配列番号 8 は、発明者らが見出した乾癬関連遺伝子 (GS21015 遺伝子) の翻訳領域全長を含むヒト cDNA の塩基配列を表し、配列番号 9 は、前記全長 cDNA にコードされるヒトのタンパク質 (GS21015) のアミノ酸配列を表す。

【 0 0 1 9 】

配列番号 8 に示される塩基配列及び配列番号 9 に示されるアミノ酸配列について、既知 DNA データベース (GenBank 及び EMBL) 及びプロテインデータベース (NBRF 及び SWISS-PROT) に対するホモロジー検索を行

った結果、同一分子種に由来すると考えられるものは見出されなかった。

【 0 0 2 0 】

本発明の新規ホスホリパーゼ A₂ 及びその遺伝子は、疾患治療薬、特に炎症性疾患治療薬の研究開発における新たな標的分子として有用である。とりわけ、正常組織と比較して乾癬組織において発現が増大し、かつ、皮膚組織等に特異的に発現しているため、乾癬等の炎症性皮膚疾患の治療薬の研究開発において有用である。また、炎症性疾患の発症メカニズムの研究のためにも有用である。

【 0 0 2 1 】

さらに、本発明の新規ホスホリパーゼ A₂ を利用した、阻害剤の特徴付け、同定、及び選択方法は、選択性の高い阻害剤、治療効果が高く副作用の少ない優れた医薬を開発するために有用である。

【 0 0 2 2 】

また、本発明の新規ホスホリパーゼ A₂ 及びその遺伝子は、正常組織と比較して乾癬組織において発現が増大しているため、これらの発現レベルの検定を特徴とする本発明の検査方法は、乾癬の病態の診断や検査のために有用である。

【 0 0 2 3 】

【発明の実施の形態】

本発明のタンパク質としては、配列番号 9 で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質が挙げられる。また、配列番号 9 で示されるアミノ酸配列において 1 若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質が挙げられる。アミノ酸の欠失、置換若しくは付加は、ホスホリパーゼ A₂ としての機能（生物学的活性；biological activity）、すなわち、グリセリン脂質の 2 位のエステル結合を加水分解する活性（ホスホリパーゼ A₂ 活性）が失われない程度であればよく、通常 1 ～ 約 2 0 0 個、好ましくは 1 ～ 約 1 6 0 個、より好ましくは 1 ～ 約 1 2 0 個、さらに好ましくは 1 ～ 約 8 0 個、さらに一層好ましくは 1 ～ 約 4 0 個である。

【 0 0 2 4 】

すなわち、本発明のタンパク質としては、配列番号 9 で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質の他、配列番号 9 で示されるアミノ酸配列からなるタンパク

質と比較して1若しくはそれより多くの保存的アミノ酸置換 (conservative amino acid substitutions) を有するタンパク質が挙げられる。

【0025】

このようなタンパク質には、自然界で発見される変異型タンパク質のほか、人為的に改変した変異タンパク質、異種生物由来のタンパク質等が含まれる。

【0026】

すなわち、このようなタンパク質には、配列番号9で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質の保存的置換変異体 (conservative substitution variants) 及び自然発生対立変異体 (naturally occurring allelic variants) が含まれる。

【0027】

このようなタンパク質は、配列番号9で示されるアミノ酸配列と、通常約75%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約85%以上、さらに好ましくは約90%以上、さらに一層好ましくは約95%以上のアミノ酸レベルのホモロジーを有する。

【0028】

また、このようなタンパク質は、ホスホリパーゼA₂としての機能が失われな
いために、ホスホリパーゼA₂活性を司る領域、すなわち触媒領域において、他の領域よりも、アミノ酸配列がより高度に保存されていることが望ましい。配列番号9で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質の触媒領域としては、例えば、配列番号9に示したアミノ酸配列における第275～525番目（触媒領域A）及び第613～798番目（触媒領域B）のアミノ酸残基に相当する領域が挙げられる。各触媒領域におけるアミノ酸の欠失、置換若しくは付加は、それぞれ、通常1～約20個、好ましくは1～約10個、より好ましくは1～約5個である。このようなタンパク質の各触媒領域は、配列番号9で示されたアミノ酸配列中に存在する各触媒領域と、それぞれ、通常約90%以上、好ましくは約95%以上、より好ましくは約97%以上のアミノ酸レベルのホモロジーを有する。一方、非触媒領域におけるアミノ酸の欠失、置換若しくは付加は、通常1～約160個、好ましくは1～約140個、より好ましくは1～約110個、さらに好ま

しくは1～約80個、さらに一層好ましくは1～約40個である。

【0029】

本発明の遺伝子としては、配列番号8で示される塩基配列からなるDNAからなる遺伝子が挙げられる。また、配列番号8で示される塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAからなる遺伝子が挙げられる。このようなハイブリダイズするDNAは、ホスホリパーゼA₂活性を有するタンパク質をコードするものであればよい。

【0030】

このような遺伝子は、配列番号8で示される塩基配列と、通常約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約85%以上、さらに好ましくは90%以上、さらに一層好ましくは95%以上のホモロジーを有する。このような遺伝子としては、自然界で発見される変異型遺伝子、人為的に改変した変異型遺伝子、異種生物由来の相同遺伝子（オルソログ）等が含まれる。

【0031】

本発明において、ストリンジェントな条件下でのハイブリダイゼーションは、通常、6×SSC又はこれと同等の塩濃度のハイブリダイゼーション溶液中、50～60℃の温度条件下、約16時間ハイブリダイゼーションを行い、6×SSC又はこれと同等の塩濃度の溶液等で必要に応じて予備洗浄を行った後、1×SSC又はこれと同等の塩濃度の溶液中で洗浄を行うことにより実施できる。また、より高いストリンジェンシーを有する条件（ハイストリンジェントな条件）では、前記において、洗浄を0.1×SSC又はこれと同等の塩濃度の溶液で行うことにより実施できる。

【0032】

本発明の遺伝子は、哺乳動物の組織や細胞を遺伝子源としてスクリーニングを行うことにより単離取得できる。哺乳動物としては、イヌ、ウシ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、サル、ブタ、ウサギ、ラット及びマウスなどの非ヒト動物のほか、ヒトが挙げられる。これらのうち、ヒトの治療薬の研究開発に利用する上では、ヒト由来のものをを用いることが望ましい。

【0033】

本発明の遺伝子は、本明細書中に開示された配列情報（後記配列表の配列番号 8）を利用して取得することができる。例えば、開示された塩基配列の情報をもとにプライマーやプローブを設計し、これらを用いる PCR (polymerase chain reaction) 法、コロニーハイブリダイゼーション法、プラークハイブリダイゼーション法を適宜組み合わせ、DNAライブラリーから選択・取得できる。

【 0 0 3 4 】

例えば、哺乳動物の細胞や組織から調製した mRNA から cDNA を合成し、これを鋳型として、PCR 法により cDNA 断片を得る。得られた cDNA をプローブとして用い、コロニーハイブリダイゼーション法又はプラークハイブリダイゼーション法により cDNA ライブラリーをスクリーニングして、全長 cDNA を取得できる。また、ゲノミック DNA ライブラリーをスクリーニングすることにより、ゲノム遺伝子を単離することができる。また、他の哺乳動物の DNA ライブラリーをスクリーニングすることにより、異種生物由来の相同遺伝子（オルソログ）を単離することができる。

【 0 0 3 5 】

cDNA ライブラリー及びゲノミック DNA ライブラリー等の DNA ライブラリーは、例えば、「Molecular Cloning」(Sambrook, J., Fritsch, E.F. 及び Maniatis, T. 著、Cold Spring Harbor Laboratory Press より 1989 年に発刊) に記載の方法により調製することができる。あるいは、市販のライブラリーがある場合はこれを用いてもよい。

【 0 0 3 6 】

得られた cDNA の塩基配列を決定することにより、遺伝子産物のタンパク質をコードする翻訳領域を決定でき、このタンパク質のアミノ酸配列を得ることができる。

【 0 0 3 7 】

本発明のタンパク質は、通常の遺伝子組換え技術により過剰発現 (overexpression) させ生産することができる。また、他のタンパク質やペプチドとの融合蛋白 (fusion protein) の形で発現させ生産することもできる。

【 0 0 3 8 】

本発明のタンパク質を過剰発現 (overexpression) させた細胞は、例えば、以下のようにして得ることができる。まず、本発明のタンパク質をコードするDNAを、適当なプロモーターの下流に連結される形でベクターに挿入し、発現ベクターを構築する。ついで得られた発現ベクターを宿主細胞に導入する。

【0039】

発現系 (宿主-ベクター系) としては、例えば、細菌、酵母、昆虫細胞及び哺乳動物細胞の発現系などが挙げられる。このうち、機能がよく保存されたタンパク質を得るためには、哺乳動物細胞 (サルCOS-7細胞、チャイニーズハムスターCHO細胞、ヒトHeLa細胞等) 及び昆虫細胞 (Spodoptera frugiperda SF9、SF21等) を宿主として用いることが好ましい。

【0040】

本発明のタンパク質を発現させるためのプロモーターとしては、哺乳動物細胞系の場合、SV40プロモーター、LTRプロモーター、エロンゲーション1 α プロモーター等、昆虫細胞系の場合、ポリヘドリンプロモーター等を用いることができる。

【0041】

ベクターとしては、哺乳動物細胞系の場合、レトロウイルス系ベクター、パピローマウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、SV40系ベクター等、昆虫細胞系の場合、バキュロウイルスベクター等を用いることができる。

【0042】

本発明のタンパク質をコードするDNAとしては、自然界に存在するmRNAに対応するcDNA (例えば、配列番号8に示される塩基配列からなるもの) を用いることができるが、これに限定されない。目的とするタンパク質のアミノ酸配列に対応するDNAを設計して用いることもできる。この場合、ひとつのアミノ酸をコードするコドンは各々1~6種類知られており、用いるコドンの選択は任意でよいが、例えば発現に利用する宿主のコドン使用頻度を考慮して、より発現効率の高い配列を設計することができる。設計した塩基配列を持つDNAは、DNAの化学合成、前記cDNAの断片化と結合、塩基配列の一部改変等によって取得できる。人為的な塩基配列の一部改変、変異導入は、所望の改変をコード

する合成オリゴヌクレオチドからなるプライマーを利用したPCR法や部位特異的変異導入法 (site specific mutagenesis) (Markら、Proceedings of National Academy of Sciences、第81巻、第5662-5666頁、1984年) 等によって実施できる。

【0043】

本発明のタンパク質は、発現ベクターを導入した細胞の培養物などから、公知の精製方法 (無機塩類による塩析、有機溶媒による分画沈殿、イオン交換樹脂カラムクロマトグラフィー、アフィニティーカラムクロマトグラフィー、ゲルろ過法など) を適宜組合せることによって、分離精製できる。

【0044】

本発明のタンパク質を過剰発現 (overexpression) させることにより、細胞における該タンパク質の機能又は活性を高める (増強させる) ことができる。

【0045】

本発明の遺伝子を構成するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸 (DNA若しくはRNA: オリゴヌクレオチド若しくはポリヌクレオチド) 又はその相補物 (相補的配列を有する核酸) は、本発明の遺伝子を検出するためのプローブ又はプライマーとして使用できる。また、遺伝子の発現を変調 (例えば抑制) させるために、例えばアンチセンスオリゴヌクレオチドや、リボザイム、デコイとして使用することもできる。このような核酸又はその相補物としては、例えば、配列番号8で示される塩基配列からなるDNAの、通常、連続する14塩基以上の部分配列又はその相補的な配列を有するヌクレオチドを用いることができる。

【0046】

本発明のタンパク質、又はこれと免疫学的同等性を有するタンパク質若しくはペプチド (タンパク質の断片又は部分配列を有する合成ペプチド等) を抗原として用いて、本発明のタンパク質を認識する抗体を取得することができる。ここで、免疫学的同等性を有するとは、例えば本発明のタンパク質に対する抗体と交差反応を生じるということを意味する。

【0047】

ポリクローナル抗体は、宿主動物（例えば、ラットやウサギ等）に抗原を接種し、免疫血清を回収する通常の方法により製造することができる。モノクローナル抗体は、通常のハイブリドーマ法などの技術により製造できる。また、モノクローナル抗体の遺伝子を改変してヒト化モノクローナル抗体等を作製できる。

【 0 0 4 8 】

前記で得られた抗体を用いて、通常の免疫化学的方法（immunochemical assay 法など）により、本発明のタンパク質の細胞中又は組織中等における発現を検出することができる。あるいは、抗体を用いるアフィニティークロマトグラフィーにより本発明のタンパク質の精製を実施することができる。また、中和抗体を用いて、本発明のタンパク質の機能又は活性を変調させる（例えば抑制する）ことができる。

【 0 0 4 9 】

本発明のタンパク質が、ホスホリパーゼ A₂ 活性を有することは、一般的に知られた通常のホスホリパーゼ A₂ 活性の測定方法（Underwoodら、The Journal of Biological Chemistry、第273巻、第21926-21932頁、1998年）によって確認することができる。

【 0 0 5 0 】

また、本発明のタンパク質は、ホスホリパーゼ A₂ 阻害剤の特徴付け、同定又は選択のために使用することができる。

【 0 0 5 1 】

例えば、当該タンパク質、グリセロリン脂質及び被験物質（好ましくは低分子化合物等）を含む系内で酵素反応を行い、酵素活性（グリセロリン脂質の2位のエステル結合を加水分解する活性）に対する被験物質の阻害活性を検定する。

【 0 0 5 2 】

あるいは、当該タンパク質及び被験物質（好ましくは低分子化合物等）を含む系内で結合反応を行い、被験物質が当該タンパク質に対して結合能を有するか否かを検定する。結合能力を有する被験物質（リガンド）は阻害剤となる可能性が高い。

【 0 0 5 3 】

さらに、被験物質(好ましくは低分子化合物等)について、当該タンパク質に対する阻害作用(又は結合能)を調べ、他の型のホスホリパーゼA₂に対する阻害作用(又は結合能)と比較することによって、阻害作用(又は結合能)の選択性を判定できる。これにより、特定の型のホスホリパーゼA₂に対して相対的に高い作用を有する阻害剤(選択的な阻害剤)を選択することができる。また、阻害剤を同定し、特徴付けることができる。

【0054】

また、本発明のタンパク質をコードする遺伝子、すなわち本発明の遺伝子は、正常組織と比較して乾癬組織において発現が増大している遺伝子である。従って、本発明の遺伝子の発現レベルを生体試料について検定することにより、乾癬の病態等を診断又は検査することができる。このような検査方法は、例えば、乾癬に罹患しているかどうかの判定、乾癬の病態の特徴の判定、乾癬の重症度の判定、乾癬の治療薬や治療方法の効果の判定などに利用でき、とりわけ、尋常性乾癬のために好適に適用される。また、ヒトの乾癬に対して適用される他、サル、イヌ、ラット、マウス等の哺乳動物の乾癬モデルに対しても適用される。

【0055】

この検査方法は、ヒト又は非ヒト動物の個体(乾癬に罹患している患者や乾癬への罹患が疑われる人など)から、生体試料を採取・調製した後、この生体試料を用いて、本発明の遺伝子の発現レベルを検定することにより実施する。

【0056】

生体試料としては、動物(ヒト又は非ヒト)個体由来の細胞、組織などが挙げられる。組織としては、皮膚組織が挙げられ、特に、落屑など乾癬病変部位の皮膚組織などが好ましい。細胞としては、皮膚組織中などに存在する上皮細胞などが挙げられる。

【0057】

生体試料中での本発明の遺伝子の発現レベルの検定は、例えば、生体試料からmRNAを抽出し、このmRNA(又は対応するcDNA)中に存在する本発明の遺伝子由来のmRNAを検出・検定することにより実施できる。あるいは、遺伝子産物である本発明のタンパク質を検出・検定してもよい。

【0058】

本発明の遺伝子由来の mRNA（又は対応する cDNA）の検出・検定には、RT-PCR（reverse transcriptase-polymerase chain reaction）法（「PCR Protocols」 Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ and White TJ eds., Academic Press, San Diego, 1990年）、RT-PCR法を応用した iAFLP法（Kawamoto ら、Genome Research、第9巻、第1305-1312頁、1999年）、DNAマイクロアレイ法もしくはDNAマイクロチップ法（Schena ら、Science、第270巻、第467-470頁、1995年；Fodor ら、Science、第251巻、第767-773頁、1991年）、及び、通常のノーザンブロットイング法などを利用することができる。

【0059】

これらのうち、RT-PCR法は、感度や操作性の点で好適である。また RT-PCR法を応用した iAFLP法は、RT-PCR法よりもさらに効率的でハイスループット化された方法であり、多数のサンプルの検定に好適である。

【0060】

例えば、RT-PCR法を利用する場合は、本発明の遺伝子由来の mRNA（又は対応する cDNA）中の特異的な塩基配列を有する領域を含む断片を増幅するための適当なプライマーを設計、合成する。これらプライマーを用い、生体試料の mRNA より合成した cDNA を鋳型として PCR を実施する。得られた PCR 産物を、必要に応じて電気泳動などにより分離し、その断片を検出して存在量を検定すればよい。

【0061】

mRNA（又は対応する cDNA）の検出・検定においては、通常、本発明の遺伝子由来の mRNA（又は対応する cDNA）中の特異的な塩基配列を有する領域にハイブリダイズする核酸（オリゴヌクレオチドなど）又はその相補物を設計・合成して、これをプローブ又はプライマーとして用いる。

【0062】

特異的な塩基配列を有する領域は、特に限定されないが、mRNA（又は対応する cDNA）の 3' 末端側の領域は、個々の遺伝子における配列特異性が高いので、この領域に対応するプローブ又はプライマーを採用することが、検出・検

定において遺伝子発現量が適切に反映されるという点で好ましい。本発明の遺伝子におけるこのような3'末端側領域としては、例えば、GS21015遺伝子のmRNAのポリAから上流の最初に出現するMboI認識部位までの領域、すなわち、配列番号4に示した塩基配列を有する領域が挙げられる。

【0063】

遺伝子産物である本発明のタンパク質を検出することによって本発明の遺伝子の発現を検出・検定する場合には、例えば、本発明のタンパク質を特異的に認識する抗体を上記方法によって作製し、これを利用して通常の免疫化学的方法で検出する方法を用いることができる。

【0064】

以下、実施例をもって本発明をさらに詳しく説明するが、これらの実施例は本発明を制限するものではない。

【0065】

なお、下記実施例において、各操作は特に明示がない限り、「モレキュラークローニング (Molecular Cloning)」(Sambrook, J., Fritsch, E.F.及びManiatis, T. 著、Cold Spring Harbor Laboratory Pressより1989年に発刊)に記載の方法により行うか、又は、市販の試薬やキットを用いる場合には市販品の指示書に従って使用した。

【0066】

【実施例】

実施例1 ボディー・マップ法による乾癬関連遺伝子の探索

大久保らの文献 (Methods in Molecular Genetics、第5巻、第17-33頁、1994年)記載の方法に従って、ボディー・マップ (Body Map) 法により、以下のように、乾癬関連遺伝子のランダムスクリーニングを行った。

【0067】

(1) ベクタープライマーの調製

ベクタープラスミドpUC119 (宝酒造社製) を制限酵素PstIで消化した後、 $[^3\text{H}]$ dTTP及びターミナルトランスフェラーゼとともに反応させて末端にオリゴdT (約30~35個) を付加した。ベクタープラスミドpUC1

19は、dam⁺細菌（菌株名 DH5 α ；東洋紡社）を宿主として複製し調製することにより、制限酵素Mbo Iによる消化を受けないようにしたものを用いた。オリゴdTの付加状況は、RI放射線活性（radioactivity）の取り込みによってモニターした。ついでこのベクターをHinc IIで消化した後、フェノールクロロホルムによる抽出と数回のエタノール沈殿を行い、さらにオリゴ（dA）セルロースカラムを用いて長い方のベクター断片を精製・取得した。このベクター断片をプライマー（ベクタープライマー）として用いた。

【0068】

（2）3'-指向性cDNAライブラリーの作製と各クローンの塩基配列の決定

乾癬患者から採取した皮膚組織（病変部の落屑性皮膚組織）1例及び正常人から採取した皮膚組織1例の各々を、クールミル（東洋紡社製）中で物理的に破碎した後、これらサンプルから、RNA調製用キット（QIAGEN社製、RNeasy kit）を用いてトータルRNAを調製した。

【0069】

かくして得られたトータルRNA（各約1 μ g）（乾癬患者又は正常人由来）を鋳型とし、前記（1）で調製したベクタープライマー（50ng）をプライマーとして、MMLV（Moloney murine leukemia virus）のリバーシ・トランスクリプターゼ（Superscript II；BRL社製）を用いて、鋳型の3'側から一本鎖cDNAを合成した後、ポリメラーゼ及びリガーゼなどを用いて二本鎖cDNAを合成した。さらにガラスミルク（BIO 101社製）（あるいはフェノールクロロホルムによる抽出とエタノール沈殿）を用いてcDNAを精製・取得した。

【0070】

得られた二本鎖cDNA（ベクターに付加されたもの）を制限酵素Mbo I（GATC配列を認識する）及びBamHIで消化し、さらにMbo Iアダプターを連結した後、ベクターを含む断片を環状化した。これを大腸菌（菌株名 DH5 α ；東洋紡社）に導入し形質転換株を得た。

【0071】

得られた形質転換株のコロニー（正常人及び乾癬患者組織由来クローンについて各々約1万個ずつ）を自動釣菌装置を用いて96穴プレートに拾った。96穴プレート上で菌体を培養した後、オートクレーブにて加熱（90℃、20分）して溶菌させた。菌溶解液をミリポアフィルターで濾過して上清を得、これを鋳型としてPCRを行うことにより、ベクタープラスミドの挿入断片を増幅した。PCRは、93℃で30秒、50℃で60秒、及び72℃で2分の条件で27サイクル行い、最終サイクルとして72℃で5分間の条件で1サイクルを行って反応終了した。また、PCR用のプライマーは、挿入断片を囲むベクター部分の塩基配列をもとに設計し、センスプライマーとしては、後記配列表配列番号1記載の塩基配列のオリゴヌクレオチド（FW（-40））を、アンチセンスプライマーとしては、配列番号2記載の塩基配列のオリゴヌクレオチド（RV（-14））を各々用いた。

【0072】

次に、前記で得られたPCR産物について、ダイデオキシ法によりシーケンス反応を行った後、自動DNAシーケンサー（Applied Biosystems社製、373A）を用いて塩基配列を決定した。シーケンス反應用のプライマーとしては、ベクターに由来する配列番号3記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチド（ベクタープライマー）を用いた。

【0073】

かくして、正常及び乾癬皮膚組織由来のcDNAクローン各1万個を塩基配列決定に供し、塩基配列が解読できなかったものやミトコンドリア由来のクローンを除いた結果、正常組織由来の約4300クローン及び乾癬組織由来の約3700クローンの塩基配列情報が得られた。ヒト皮膚組織（乾癬と正常）で発現する遺伝子の種類としては、計約3000種類の遺伝子情報が得られた。

【0074】

前記で得られた遺伝子情報のうち、クローンGS21015について得られたcDNA配列情報（すなわち、cDNA3'末端のポリAから最初に出現するMboIサイトまでの塩基配列）は、後記配列表の配列番号4に示した通りであった。

【0075】

実施例2 iAFLP法による発現プロファイル解析

前記実施例1で得られたクローンについて、川本らの文献 (Genome Research、第9巻、1305-1312頁、1999年) 記載の方法に従って、RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction) を利用した iAFLP (introduced amplified fragment length polymorphism) 法により、乾癬組織及び正常組織の間での発現プロファイルの相違を解析した。

【0076】

まず、乾癬患者から採取した皮膚組織 (病変部の落屑性皮膚組織) 10例 (P01、P02、P03・・・、P10と称する) 及び正常人から採取した皮膚組織7例 (N01、N02、N03・・・、N07と称する) の各々からトータルRNAを調製した。

【0077】

得られたRNAを鋳型とし、前記実施例1の(1)で調製したベクタープライマーをPCRに用いて、前記実施例1の(2)と同様に処理することにより、3'側二本鎖cDNA (ベクターに付加されたもの) を取得した。かくして、得られた3'側二本鎖cDNA (ベクターに付加されたもの) を各組織に由来するcDNAプールとして以下に用いた。

【0078】

前記で得た各cDNAプール全量を制限酵素MboI (GATC配列を認識する) で消化した後、各々に増幅用アダプターを連結した。増幅用アダプターとしては、同時処理してもPCR産物を区別することができるように長さが3塩基長ずつ異なる5種類のアダプター (LP40、LP43、LP46、LP49、及びLP52) を以下のような組合せで用いた。

P01、P06、N01、N06 → LP40 (40塩基長) と連結

P02、P07、N02、N07 → LP43 (43塩基長) と連結

P03、P08、N03 → LP46 (46塩基長) と連結

P04、P09、N04 → LP49 (49塩基長) と連結

P05、P10、N05 → LP52 (52塩基長) と連結

また、スタンダード (reference) として、各 cDNA プールに代えて、市販のヒト臓器由来 cDNA ライブラリー 30 種を混合したものを扱い、これには 6 種類目の増幅アダプター (LP55 ; 55 塩基長) を連結した。

【0079】

前記のようにして増幅用アダプターを連結した cDNA を鋳型とし、PCR を行った。PCR のセンスプライマーとしては、6 種類の増幅用アダプターに共通の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを蛍光標識したもの (F-T7(25) プライマー、PE Biosystems 社製) (2 pmole) を用いた。アンチセンスプライマーとしては、発現量を検出したい遺伝子 (クローン) に特有の配列 (すなわち cDNA の 3' 末端ポリ A から最初に出現する MboI サイトまでの塩基配列中での特異的配列) をもとに設計し合成したオリゴヌクレオチド (2 pmole) を用いた。クローン GS21015 の遺伝子発現を検出するためのアンチセンスプライマーとしては、具体的には、配列番号 5 に示した塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを用いた。

【0080】

PCR は、異なる種類の増幅用アダプターを連結した 3 ~ 5 種類の鋳型及びスタンダード用鋳型を、一反応液 (10 μ l) 中に、以下のように、等量ずつ混合して行った。

反応液 1 = N01、N02、P03、P04、P05、及びスタンダード

反応液 2 = N03、N04、P01、P02、P06、及びスタンダード

反応液 3 = N05、N06、P07、P08、及びスタンダード

反応液 4 = N07、P09、P10、及びスタンダード

PCR の反応は、94℃で30秒、55℃で30秒、及び72℃で30秒の条件で35サイクル行い、最終サイクルとして72℃で30秒の条件で1サイクルを行って反応終了した。

【0081】

得られたPCR産物については、ABIの自動シーケンサー（ABI社製）を用いて、電気泳動し蛍光を検出・定量した。

【0082】

各組織サンプルのcDNAプールに由来する検出値について、スタンダードcDNAに由来する検出値に対する相対値を算出し、この値をもって、各組織サンプル中の遺伝子（転写産物）発現量の相対値とした。

【0083】

前記のようにして、クローンGS21015の遺伝子発現プロファイルを解析した結果は、図1に示した通りであった。

【0084】

クローンGS21015に対応する遺伝子（GS21015遺伝子）は、乾癬患者由来の皮膚組織中では正常人由来の皮膚組織中と比較して高い発現レベルを示していた。GS21015遺伝子は、乾癬患者組織に特異的な発現プロファイルを示すことから、乾癬の病態の診断や検査のために使用できることがわかった。

【0085】

実施例3 GS21015遺伝子（全長cDNA）のクローニング

前記実施例2にて遺伝子発現プロファイルを確認したクローンGS21015について、以下のようにして、翻訳領域全長を含むcDNAを取得した。

【0086】

実施例1で得られた配列情報（3'末端のポリAから最初に出現するMboIサイトまでのcDNA塩基配列：配列番号4）をもとに、BLASTプログラムを用い、既知DNAデータベース（GenBank及びEMBL）を検索した結果、ゲノムドラフト配列にヒットした。このドラフト配列から、エクソン抽出ソフト（GeneScan）を用いてエクソンを抽出し、アミノ酸配列に置き換えてプロテインデータベース（NBRF及びSWISS-PROT）を検索した結果、細胞質ホスホリパーゼA₂（cPLA₂）と高い相同性を示した。

【0087】

この仮想エクソン情報を基にPCR用プライマー（配列番号6及び7）を設計し、これを用いたPCRにより、乾癬組織由来のcDNAから、GS21015遺伝子のcDNAの3'末端断片（1246bp）を取得した。

【0088】

さらに、このcDNA断片をプローブとして用いて、乾癬組織由来cDNAライブラリーをスクリーニングした。cDNAライブラリーは、乾癬患者の皮膚組織（病変部の落屑性皮膚組織）から調製したmRNAを鋳型として合成したcDNAをλZapベクターに挿入して調製したものをを用いた。スクリーニングの結果、GS21015遺伝子の翻訳領域全域を含む全長cDNAを取得した。

【0089】

得られた全長cDNAの塩基配列を決定し解析した。全長cDNAの塩基配列（3587bp）を配列番号8に示し、それにコードされるタンパク質のアミノ酸配列（818アミノ酸残基）を配列番号9に示した。アミノ酸配列から推定されるタンパク質の分子量は約92kDaであった。

【0090】

また、配列番号8に示した塩基配列について、FASTA及びBLASTプログラムを用い、既知DNAデータベース（GenBank及びEMBL）に含まれる全ての配列に対してホモロジー検索を行った。さらに、配列番号9に示したアミノ酸配列について、FASTA及びBLASTプログラムを用い、プロテインデータベース（NBRF及びSWISS-PROT）に含まれる全ての配列に対してホモロジー検索を行った。

【0091】

ホモロジー検索及び解析の結果、配列番号9に示したアミノ酸配列は、細胞質ホスホリパーゼA₂（cPLA₂）のアミノ酸配列と部分的に相同性を有していることが見出された。

【0092】

配列番号9に示したGS21015のアミノ酸配列と、cPLA₂の分子種として従来から知られているcPLA₂α、cPLA₂β及びcPLA₂γのアミノ酸配列とを比較した結果を図2に示した。

【0093】

アミノ酸配列の類似性から、GS21015の触媒領域は、第275～525番目（触媒領域A）及び第613～798番目（触媒領域B）のアミノ酸残基に相当する領域であると推定された。また、GS21015は、cPLA₂α及びcPLA₂βと同様に、N末端側（第24～145番目のアミノ酸残基に相当する領域）にリン脂質結合領域を有し、Ca²⁺濃度依存的にリン脂質膜に結合すると推定された。

【0094】

GS21015のアミノ酸配列を、cPLA₂α、cPLA₂β及びcPLA₂γのアミノ酸配列と比較すると、触媒領域Aにおいては、cPLA₂αと31.3%、cPLA₂βと66.0%、cPLA₂γと31.7%の相同性を示し、触媒領域Bにおいては、cPLA₂αと28.9%、cPLA₂βと51.4%、cPLA₂γと36.4%の相同性を示した。リン脂質結合領域においては、cPLA₂αと31.3%、cPLA₂βと45.9%の相同性を示した。

【0095】

これらアミノ酸配列の比較解析結果から、GS21015は、cPLA₂のファミリーであり、中でも、cPLA₂βに最も近い分子種であると推定された。

【0096】

また、ゲノムドラフト配列の情報から、GS21015遺伝子は、cPLA₂βと同じ第15染色体上に位置することが判明した。

【0097】

実施例4 GS21015の過剰発現 (over expression)

前記実施例3で取得したGS21015遺伝子(全長cDNA)をPCRにより増幅した。この際、PCRプライマーとしては、cDNA断片の5'側及び3'側末端に、各々、EcoRI認識部位が付加されるように設計したものをを用いた。

【0098】

次いで、得られたPCR産物(GS21015の翻訳領域全長を含むcDNA断片)を、ベクタープラスミドp cDNA4 HisMax (Invitrogen社製)のEcoRI認識部位に挿入することにより、GS21015の発現用ベクター

プラスミドを構築した。この発現用ベクタープラスミドは、GS21015のN末端に、ヒスチジン(His)タグを付加したタンパク質を発現させるよう構成されている。

【0099】

COS-7細胞(理研RCB0539)を、 2×10^6 細胞/10cmディッシュの濃度で播き、一晚培養した。前記で構築した発現用ベクタープラスミド(又は対照としてベクタープラスミドpcDNA4 HisMax)の10 μ gを、リポフェクション試薬(Qiagen社製、superfect)とともに用いてCOS-7細胞にトランスフェクションした後、さらに48時間培養した。

【0100】

培養後の細胞を用い、以下のように、ウエスタンブロッティング法により、過剰発現させたGS21015(N末端、Hisタグを付加したもの)を検出した。すなわち、培養後の細胞を回収し、緩衝液(10mM HEPES pH7.5、1mM EDTA、0.34M ショ糖、1mM PMSF、0.1M DTT)500 μ lを加えて細胞溶解した。この細胞溶解液を遠心(15,000rpm、15分間)し、上清を分取した後、その10 μ lをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した。

【0101】

次いで、セミドライ法により、泳動タンパク質をPVDF膜(Millipore社製、Immobilon-P membrane)に転写した後、膜をブロッキング試薬(ブロックエース、大日本製薬社製)を含む溶液中に4℃で一夜浸漬してブロッキングした。さらに、抗Hisタグ抗体(QIAGEN社製)(1000倍希釈)と室温で2時間反応させた後、PBS-Tween(0.1% Tweenを含むリン酸緩衝化生理食塩水)で洗浄した。次いで、ペルオキシダーゼ標識した抗マウスIgG抗体(Sigma社製)と室温で2時間反応させた後洗浄し、さらに発色試薬(ECLシステム、Amersham社製)を用いて、抗Hisタグ抗体と結合した膜中のタンパク質バンドを検出した。

【0102】

その結果、タグ付加されたGS21015に相当する分子量約97kD付近に

、主たる陽性バンドが認められた。

【0103】

実施例5 GS21015のホスホリパーゼA₂活性の測定

前記実施例4で分取した細胞溶解液の上清について、1-パルミトイル-2-アラキドニル-ホスファチジルコリンを基質とする加水分解活性（2位のエステル結合を加水分解してアラキドン酸を遊離する活性）を以下のようにして測定することにより、GS21015のホスホリパーゼA₂活性を調べた。

【0104】

まず、窒素ガス下で乾燥させた1-パルミトイル-2-[¹⁴C]アラキドニル-ホスファチジルコリン（Life Science Products 社製）を、2 μMになるように反応用緩衝液〔10 mM HEPES pH 7.5、10 mM 塩化カルシウム、150 mM 塩化ナトリウム、30% グリセロール、1 mg/ml ウシ血清アルブミン（脂肪酸非含有）〕に加えて攪拌し、浴槽型超音波洗浄機に30分浸した後、再び攪拌した。この基質溶液250 μlに、前記実施例4で分取した、発現用ベクタープラスミドをトランスフェクションして得た細胞溶解液の上清（又は対照としてpcDNA4 HisMaxをトランスフェクションして得た細胞溶解液の上清）を10 μl添加して、反応を開始した。37℃で、0、15、30、又は60分間保温して反応を行った後に、ドール試薬（2-プロパノール：ヘプタン：1N 硫酸＝20：5：1）1.25 mlを加えて反応を停止させた。さらに、カラムクロマトグラフィー用シリカゲル（富士シリシア化学社製）0.1 gを加えて攪拌し、ヘプタン0.75 ml及びイオン置換水0.75 mlを加えて10秒以上攪拌した。その上層（ヘプタン層）を0.5 ml取り、シンチレーション液5 mlと混合後、シンチレーションカウンターでラジオ活性を測定した。

【0105】

その結果（反応時間と活性との相関）は図3の通りであり、GS21015がPLA₂活性を有することが明らかとなった。

【0106】

実施例6 *in situ* ハイブリダイゼーション法によるGS21015の発現解析

ヒトの乾癬皮膚組織及び正常皮膚組織を用いて *in situ* ハイブリダイゼーションを行うことにより、ヒトの皮膚組織におけるGS21015 mRNAの発現を解析した。

【0107】

in situ ハイブリダイゼーションにおけるプローブとしては、前記実施例3で取得したGS21015遺伝子(全長cDNA)の断片(当該断片の塩基配列は、配列番号8に示した塩基配列の第2522～3236番目の塩基配列に相当する。)をpBlue-scriptベクター(Stratagene社製)に組み込み、制限酵素XbaI及びAccIで処理した後に、これを鋳型としてT7 RNAポリメラーゼ及びT3 RNAポリメラーゼによる転写を行って得たcRNAプローブを用いた。また、皮膚組織切片の作製及び*in situ* ハイブリダイゼーションは、文献(野村慎太郎ら、細胞工学 別冊(9)脱アイソトープ実験プロトコール(1)DIGハイブリダイゼーション、第72-82頁、1994年)記載の方法に準じて行った。

【0108】

その結果、GS21015 mRNAは、乾癬皮膚組織の表皮上層で発現していることが認められた。また、正常皮膚組織においては発現がほとんど検出されなかった。従って、乾癬皮膚組織においては正常皮膚組織と比較してGS21015 mRNAの発現が増大していることが確認された。

【0109】

実施例7 ノーザンブロッティング法によるGS21015の発現解析
各種のヒト組織由来mRNAをブロットした市販膜〔東洋紡績社製GeneHunter(コード番号:MRB-111、MRB-112、MRB-113、MRB-114、MRB-311、及びMRB-312)〕を用いてノーザンブロッティングを行うことにより、ヒトの各種組織におけるGS21015 mRNAの発現を解析した。

【0110】

ノーザンブロッティングにおけるプローブとしては、前記実施例3で取得したGS21015遺伝子(全長cDNA)の断片(当該cDNA断片の塩基配列は、配列番号8に示した塩基配列の第99～770番目の塩基配列に相当する。)を

、 ^{32}P で標識して用いた。

【0111】

ノーザンブロッティングの結果、GS21015 mRNAの強い発現が胎児皮膚組織及び成人子宮頸部組織において認められ、弱い発現が成人子宮組織及び成人前立腺組織において認められたが、その他の組織では発現は認められなかった。cPLA₂α、cPLA₂β及びcPLA₂γは、ほぼすべての組織で発現することが知られており (Pickardら、The Journal of Biological Chemistry、第274巻、第8823-8831頁、1999年)、この点でGS21015は既知のcPLA₂と大きく異なることが判明した。

【0112】

「配列表フリーテキスト」

配列番号1～3及び5～7のフリーテキスト

<223>人工的に合成されたプライマーの配列 (Artificially Synthesized Primer Sequence)

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Tanabe Seiyaku Co., Ltd.

<120> A Novel Phospholipase A₂ and the gene thereof.

<130> A00-4783

<160> 9

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificially synthesized primer sequence

<400> 1

gttttcccag tcacgacgtt g

21

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificially synthesized primer sequence

<400> 2

accatgatta cgccaagctt g

21

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificially synthesized primer sequence

<400> 3

tgtaaaacga cggccagt

18

<210> 4

<211> 87

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

gatcatgtgg tttgtcgtg tatattatta atgtactcta ttgcattaat tggtttttgg 60

atattaaacc aactttgcat tcctaaa

87

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificially synthesized primer sequence

<400> 5

gtacacgaca aaaccacatg a

21

<210> 6

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificially synthesized primer sequence

<400> 6

gtccagcgca gccccgcaga gctcc

25

<210> 7

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificially synthesized primer sequence

<400> 7

aaatacacga caaaaccaca tgatc

25

<210> 8

<211> 3587

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (99)..(2552)

<400> 8

ggcgcgtgtc ctatcccact gggaccgtcg ctgccactca gccagagagc cagcatcttg 60

gcaagggctg ggcctggagt gaagctggaa gggctagc atg gag agc ctg tca cct 116

Met Glu Ser Leu Ser Pro

1

5

ggg gga cca act ggc cac cct tac cag ggg gag gcc tct acc tgc tgg 164

Gly Gly Pro Thr Gly His Pro Tyr Gln Gly Glu Ala Ser Thr Cys Trp

10

15

20

cag ctc aca gtg agg gtc ctg gag gcg cgg aac ctg cgc tgg gct gac 212

Gln Leu Thr Val Arg Val Leu Glu Ala Arg Asn Leu Arg Trp Ala Asp

25

30

35

ctg ttg agt gag gcc gac cct tac gtg atc cta cag ctg tcg acc gca 260

Leu Leu Ser Glu Ala Asp Pro Tyr Val Ile Leu Gln Leu Ser Thr Ala

40

45

50

cct gga atg aag ttt aag acc aag acg ctc acc gac acc agt cat cct 308

Pro Gly Met Lys Phe Lys Thr Lys Thr Leu Thr Asp Thr Ser His Pro

55

60

65

70

gtg tgg aat gag gcc ttc cgt ttc ctt atc caa agt cag gtc aag aat 356

Val Trp Asn Glu Ala Phe Arg Phe Leu Ile Gln Ser Gln Val Lys Asn

75

80

85

gtt ctg gag ctt agc atc tat gat gag gac tca gtc acg gag gat gac 404

Val Leu Glu Leu Ser Ile Tyr Asp Glu Asp Ser Val Thr Glu Asp Asp

90

95

100

atc tgc ttc aag gtt ctc tat gac atc tca gaa gtc ctc cct ggc aag 452

Ile Cys Phe Lys Val Leu Tyr Asp Ile Ser Glu Val Leu Pro Gly Lys

105

110

115

ctg ctc cgg aaa acc ttc tcc cag agt ccc cag gga gag gag gag ctg 500

Leu Leu Arg Lys Thr Phe Ser Gln Ser Pro Gln Gly Glu Glu Glu Leu

120

125

130

gat gtg gag ttc ctg atg gaa gaa acg tca gat cgc cca gaa aac ctc 548

Asp Val Glu Phe Leu Met Glu Glu Thr Ser Asp Arg Pro Glu Asn Leu

135

140

145

150

atc acc aac aaa gtc att gtg gcc cga gag ctg tca tgc ctg gat gtg 596

Ile Thr Asn Lys Val Ile Val Ala Arg Glu Leu Ser Cys Leu Asp Val

155

160

165

cat ctg gac agc aca ggg agc acc gct gtg gtt gca gat cag gac aag 644

His Leu Asp Ser Thr Gly Ser Thr Ala Val Val Ala Asp Gln Asp Lys

170

175

180

ctg gag ctg gag ctg gtg ctg aag ggg tcc tat gag gac aca cag aca 692

Leu Glu Leu Glu Leu Val Leu Lys Gly Ser Tyr Glu Asp Thr Gln Thr

185

190

195

tcc ttc ctg ggc aca gcc tct gcc ttc cgc ttc cac tac atg gca gcc 740

Ser Phe Leu Gly Thr Ala Ser Ala Phe Arg Phe His Tyr Met Ala Ala

200

205

210

cta gag aca gag ctg agc ggg cgc ctg agg agc tcc aga agc aat ggc 788

Leu Glu Thr Glu Leu Ser Gly Arg Leu Arg Ser Ser Arg Ser Asn Gly

215

220

225

230

tgg aat ggg gac aac tca gct ggg tac ctc act gtg ccc ctg agg ccc 836

Trp Asn Gly Asp Asn Ser Ala Gly Tyr Leu Thr Val Pro Leu Arg Pro

235

240

245

ttg acc att ggg aag gag gtg act atg gat gtt cct gct cca aat gcc 884

Leu Thr Ile Gly Lys Glu Val Thr Met Asp Val Pro Ala Pro Asn Ala

250

255

260

cca gga gtg agg ctg cag ctc aag gca gag ggc tgc cct gag gag ctg 932

Pro Gly Val Arg Leu Gln Leu Lys Ala Glu Gly Cys Pro Glu Glu Leu

265

270

275

gcc gtg cac ctg ggc ttc aat ctc tgt gca gag gag cag gcc ttc ctg 980

Ala Val His Leu Gly Phe Asn Leu Cys Ala Glu Glu Gln Ala Phe Leu

280

285

290

agc agg agg aag cag gtg gtg gcc aag gcc ctg aag cag gcc ctg cag 1028

Ser Arg Arg Lys Gln Val Val Ala Lys Ala Leu Lys Gln Ala Leu Gln

295

300

305

310

ctg gac aga gac ctg cag gag gat gag gta ccc gtt gtg ggc atc atg 1076
 Leu Asp Arg Asp Leu Gln Glu Asp Glu Val Pro Val Val Gly Ile Met

315

320

325

gcc aca gga gga ggt gcc cgg gcc atg acc tca ctc tac ggc cac cta 1124
 Ala Thr Gly Gly Gly Ala Arg Ala Met Thr Ser Leu Tyr Gly His Leu

330

335

340

ttg gcc ttg cag aag ctg ggc ctc cta gac tgt gtg acc tac ttc agt 1172
 Leu Ala Leu Gln Lys Leu Gly Leu Leu Asp Cys Val Thr Tyr Phe Ser

345

350

355

ggc atc tct ggc tct acg tgg aca atg gcc cac ctg tac ggg gac cct 1220
 Gly Ile Ser Gly Ser Thr Trp Thr Met Ala His Leu Tyr Gly Asp Pro

360

365

370

gag tgg tcg cag agg gac ctg gag gga cct atc aga tac gcc cgg gag 1268
 Glu Trp Ser Gln Arg Asp Leu Glu Gly Pro Ile Arg Tyr Ala Arg Glu

375

380

385

390

cac ctg gcc aag agc aag ctg gag gtc ttt tcc cca gag cgc ctg gcg 1316
 His Leu Ala Lys Ser Lys Leu Glu Val Phe Ser Pro Glu Arg Leu Ala

395

400

405

agc tac cgc cgg gag ctg gag ctg cgg gct gag cag ggc cac ccc acg 1364
 Ser Tyr Arg Arg Glu Leu Glu Leu Arg Ala Glu Gln Gly His Pro Thr

410

415

420

acc ttt gtg gac ctg tgg gcg cta gtg ctg gag tcc atg ctg cac ggc 1412

Thr Phe Val Asp Leu Trp Ala Leu Val Leu Glu Ser Met Leu His Gly
425 430 435

cag gtg atg gat cag aag ctg tca gga cag aga gcc gcc ctg gaa cgg 1460
Gln Val Met Asp Gln Lys Leu Ser Gly Gln Arg Ala Ala Leu Glu Arg
440 445 450

ggt cag aac cct ctg ccc ctc tac ttg agc ctc aat gtc aaa gag aac 1508
Gly Gln Asn Pro Leu Pro Leu Tyr Leu Ser Leu Asn Val Lys Glu Asn
455 460 465 470

aat ctg gag aca ctg gac ttc aag gag tgg gtt gag ttc tcc ccc tat 1556
Asn Leu Glu Thr Leu Asp Phe Lys Glu Trp Val Glu Phe Ser Pro Tyr
475 480 485

gag gtc ggt ttc ctg aag tac ggg gcc ttc gtc cct cct gag ctc ttc 1604
Glu Val Gly Phe Leu Lys Tyr Gly Ala Phe Val Pro Pro Glu Leu Phe
490 495 500

ggc tcc gag ttc ttc atg gga cgg ctg atg agg agg atc ccg gag ccc 1652
Gly Ser Glu Phe Phe Met Gly Arg Leu Met Arg Arg Ile Pro Glu Pro
505 510 515

cgg atc tgc ttt ctg gaa gcc atc tgg agc aac att ttc tcc ctg aac 1700
Arg Ile Cys Phe Leu Glu Ala Ile Trp Ser Asn Ile Phe Ser Leu Asn
520 525 530

ctg ctg gat gcc tgg tat gac ctc acc agt tct ggg gag tcc tgg aaa 1748
Leu Leu Asp Ala Trp Tyr Asp Leu Thr Ser Ser Gly Glu Ser Trp Lys

535

540

545

550

cag cac atc aag gac aag acc agg agc tta gag aag gag ccc ctg acc 1796

Gln His Ile Lys Asp Lys Thr Arg Ser Leu Glu Lys Glu Pro Leu Thr

555

560

565

acc tcg ggg acc tcc tcg cgg ctg gag gcc tcg tgg ctg cag cca ggc 1844

Thr Ser Gly Thr Ser Ser Arg Leu Glu Ala Ser Trp Leu Gln Pro Gly

570

575

580

acg gcg ctg gcc cag gca ttt aaa ggc ttc ctg aca ggc agg ccc ctc 1892

Thr Ala Leu Ala Gln Ala Phe Lys Gly Phe Leu Thr Gly Arg Pro Leu

585

590

595

cac cag cgc agc ccc aac ttc ctc cag ggc ctc cag ctg cac cag gac 1940

His Gln Arg Ser Pro Asn Phe Leu Gln Gly Leu Gln Leu His Gln Asp

600

605

610

tac tgt agc cac aaa gac ttc tcc acc tgg gca gac tac cag ctt gac 1988

Tyr Cys Ser His Lys Asp Phe Ser Thr Trp Ala Asp Tyr Gln Leu Asp

615

620

625

630

tcc atg ccc agc cag ctg acc ccc aag gag ccc cgg ctc tgc ctg gtg 2036

Ser Met Pro Ser Gln Leu Thr Pro Lys Glu Pro Arg Leu Cys Leu Val

635

640

645

gac gcc gcc tac ttc atc aac acc agc tct ccc tcc atg ttc cgg cca 2084

Asp Ala Ala Tyr Phe Ile Asn Thr Ser Ser Pro Ser Met Phe Arg Pro

650

655

660

ggc cgc agg ctg gac ctc atc ctc tcc ttc gac tac tcc cta tct gcg 2132

Gly Arg Arg Leu Asp Leu Ile Leu Ser Phe Asp Tyr Ser Leu Ser Ala

665

670

675

ccc ttc gag gca ctg cag cag acg gag ctg tac tgc cgg gcc cgg ggg 2180

Pro Phe Glu Ala Leu Gln Gln Thr Glu Leu Tyr Cys Arg Ala Arg Gly

680

685

690

ctg ccc ttc ccc cgg gtg gaa ccc agc cct cag gac cag cac cag cca 2228

Leu Pro Phe Pro Arg Val Glu Pro Ser Pro Gln Asp Gln His Gln Pro

695

700

705

710

agg gaa tgc cac ctc ttc tca gac ccc gcc tgc ccc gag gcc ccg atc 2276

Arg Glu Cys His Leu Phe Ser Asp Pro Ala Cys Pro Glu Ala Pro Ile

715

720

725

ctg ctg cac ttc ccg ctg gtc aat gcc tcc ttc aag gac cac tca gcc 2324

Leu Leu His Phe Pro Leu Val Asn Ala Ser Phe Lys Asp His Ser Ala

730

735

740

ccc ggt gtc cag cgc agc ccc gca gag ctc cag ggt ggc caa gtg gat 2372

Pro Gly Val Gln Arg Ser Pro Ala Glu Leu Gln Gly Gly Gln Val Asp

745

750

755

ctc acc ggg gcc acc tgc ccc tac acc ctg tcc aac atg acc tac aag 2420

Leu Thr Gly Ala Thr Cys Pro Tyr Thr Leu Ser Asn Met Thr Tyr Lys

760

765

770

gag gaa gac ttc gag cgc ctg ctg cgg ctc agt gac tac aac gtg cag 2468
 Glu Glu Asp Phe Glu Arg Leu Leu Arg Leu Ser Asp Tyr Asn Val Gln
 775 780 785 790

acc agc cag ggt gcc atc ctg cag gcc ctg agg acc gcg ctg aag cac 2516
 Thr Ser Gln Gly Ala Ile Leu Gln Ala Leu Arg Thr Ala Leu Lys His
 795 800 805

cgg act cta gag gcg agg cct cca agg gca cag acc tgaggttgct 2562
 Arg Thr Leu Glu Ala Arg Pro Pro Arg Ala Gln Thr
 810 815

cagaggctgc aggaccctcc agggcctgcg ggcataacct gatctgtagc tgggctcagc 2622

cacaggcctt cctggttgga gttctgggct ctcccaggcc tgggtggcct ctgtagctgg 2682

tctcactgcc cagagggaac tgcacacaca gacttctctc ttacgttcat ggctggcttg 2742

agatgagttg aaaataactt cgccaggcca gtgtgtagaa cagctgggtcc aaccagacag 2802

actttcacac cacaattact tccatgcctg agcaggatag atttgaagtg caagccggag 2862

gcagcagatc aggagtaggg acaggaagga caggggatgc ctgacctgac aggtggcttc 2922

aggcctcggg aatcacaaga catcctgaac acattgcctc ctcatcttct tectgctcct 2982

ccacctcctc ctctccttgt cttctcctc tttgtcctcc tgctttccgt atccaagtct 3042

tgtacttggt taaatttatt cctaaatatt ttattctttt tgataagtgg agttactttc 3102

ttaatttcat ttagattatt cattgctatt ttatagaaat acaatggatt tttaaatggt 3162

gatcttgtat tccgcaatct tgctgaagtt gtttaccggc tctaatactt ttgcggattt 3222

cttagaattt tctgtagaca gatcatgcca tctccaaata gagatggttt tacttcttcc 3282

tgtctgatct gaatgccttt tatttatitt tcccaattgc cctgagcagt acaatgatga 3342

acacacgttt caagagcaga catcttgtct tgttcctgac tctgacaaga aagcataagt 3402

ctctcaccat ttagtgtgat ttagctgtg ggtttttctt ggacatcctt atcaggttga 3462

gaaagttctc ttttatttct agtttattga gtgttttatg atgaaacggg gttaggtttt 3522

gtcaagtgat ttttctgtgt ctatgggcat gatcatgtgg ttttgtcgtg tattttatta 3582

atgta 3587

<210> 9

<211> 818

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Met Glu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Pro Thr Gly His Pro Tyr Gln Gly

1

5

10

15

Glu Ala Ser Thr Cys Trp Gln Leu Thr Val Arg Val Leu Glu Ala Arg

20

25

30

Asn Leu Arg Trp Ala Asp Leu Leu Ser Glu Ala Asp Pro Tyr Val Ile

35

40

45

Leu Gln Leu Ser Thr Ala Pro Gly Met Lys Phe Lys Thr Lys Thr Leu

50

55

60

Thr Asp Thr Ser His Pro Val Trp Asn Glu Ala Phe Arg Phe Leu Ile

65

70

75

80

Gln Ser Gln Val Lys Asn Val Leu Glu Leu Ser Ile Tyr Asp Glu Asp

85

90

95

Ser Val Thr Glu Asp Asp Ile Cys Phe Lys Val Leu Tyr Asp Ile Ser

100

105

110

Glu Val Leu Pro Gly Lys Leu Leu Arg Lys Thr Phe Ser Gln Ser Pro

115

120

125

Gln Gly Glu Glu Glu Leu Asp Val Glu Phe Leu Met Glu Glu Thr Ser

130

135

140

Asp Arg Pro Glu Asn Leu Ile Thr Asn Lys Val Ile Val Ala Arg Glu

145

150

155

160

Leu Ser Cys Leu Asp Val His Leu Asp Ser Thr Gly Ser Thr Ala Val

165

170

175

Val Ala Asp Gln Asp Lys Leu Glu Leu Glu Leu Val Leu Lys Gly Ser
180 185 190

Tyr Glu Asp Thr Gln Thr Ser Phe Leu Gly Thr Ala Ser Ala Phe Arg
195 200 205

Phe His Tyr Met Ala Ala Leu Glu Thr Glu Leu Ser Gly Arg Leu Arg
210 215 220

Ser Ser Arg Ser Asn Gly Trp Asn Gly Asp Asn Ser Ala Gly Tyr Leu
225 230 235 240

Thr Val Pro Leu Arg Pro Leu Thr Ile Gly Lys Glu Val Thr Met Asp
245 250 255

Val Pro Ala Pro Asn Ala Pro Gly Val Arg Leu Gln Leu Lys Ala Glu
260 265 270

Gly Cys Pro Glu Glu Leu Ala Val His Leu Gly Phe Asn Leu Cys Ala
275 280 285

Glu Glu Gln Ala Phe Leu Ser Arg Arg Lys Gln Val Val Ala Lys Ala
290 295 300

Leu Lys Gln Ala Leu Gln Leu Asp Arg Asp Leu Gln Glu Asp Glu Val
305 310 315 320

Pro Val Val Gly Ile Met Ala Thr Gly Gly Gly Ala Arg Ala Met Thr

325

330

335

Ser Leu Tyr Gly His Leu Leu Ala Leu Gln Lys Leu Gly Leu Leu Asp

340

345

350

Cys Val Thr Tyr Phe Ser Gly Ile Ser Gly Ser Thr Trp Thr Met Ala

355

360

365

His Leu Tyr Gly Asp Pro Glu Trp Ser Gln Arg Asp Leu Glu Gly Pro

370

375

380

Ile Arg Tyr Ala Arg Glu His Leu Ala Lys Ser Lys Leu Glu Val Phe

385

390

395

400

Ser Pro Glu Arg Leu Ala Ser Tyr Arg Arg Glu Leu Glu Leu Arg Ala

405

410

415

Glu Gln Gly His Pro Thr Thr Phe Val Asp Leu Trp Ala Leu Val Leu

420

425

430

Glu Ser Met Leu His Gly Gln Val Met Asp Gln Lys Leu Ser Gly Gln

435

440

445

Arg Ala Ala Leu Glu Arg Gly Gln Asn Pro Leu Pro Leu Tyr Leu Ser

450

455

460

Leu Asn Val Lys Glu Asn Asn Leu Glu Thr Leu Asp Phe Lys Glu Trp

465

470

475

480

Val Glu Phe Ser Pro Tyr Glu Val Gly Phe Leu Lys Tyr Gly Ala Phe
 485 490 495

Val Pro Pro Glu Leu Phe Gly Ser Glu Phe Phe Met Gly Arg Leu Met
 500 505 510

Arg Arg Ile Pro Glu Pro Arg Ile Cys Phe Leu Glu Ala Ile Trp Ser
 515 520 525

Asn Ile Phe Ser Leu Asn Leu Leu Asp Ala Trp Tyr Asp Leu Thr Ser
 530 535 540

Ser Gly Glu Ser Trp Lys Gln His Ile Lys Asp Lys Thr Arg Ser Leu
 545 550 555 560

Glu Lys Glu Pro Leu Thr Thr Ser Gly Thr Ser Ser Arg Leu Glu Ala
 565 570 575

Ser Trp Leu Gln Pro Gly Thr Ala Leu Ala Gln Ala Phe Lys Gly Phe
 580 585 590

Leu Thr Gly Arg Pro Leu His Gln Arg Ser Pro Asn Phe Leu Gln Gly
 595 600 605

Leu Gln Leu His Gln Asp Tyr Cys Ser His Lys Asp Phe Ser Thr Trp
 610 615 620

Ala Asp Tyr Gln Leu Asp Ser Met Pro Ser Gln Leu Thr Pro Lys Glu
 625 630 635 640

Pro Arg Leu Cys Leu Val Asp Ala Ala Tyr Phe Ile Asn Thr Ser Ser
645 650 655

Pro Ser Met Phe Arg Pro Gly Arg Arg Leu Asp Leu Ile Leu Ser Phe
660 665 670

Asp Tyr Ser Leu Ser Ala Pro Phe Glu Ala Leu Gln Gln Thr Glu Leu
675 680 685

Tyr Cys Arg Ala Arg Gly Leu Pro Phe Pro Arg Val Glu Pro Ser Pro
690 695 700

Gln Asp Gln His Gln Pro Arg Glu Cys His Leu Phe Ser Asp Pro Ala
705 710 715 720

Cys Pro Glu Ala Pro Ile Leu Leu His Phe Pro Leu Val Asn Ala Ser
725 730 735

Phe Lys Asp His Ser Ala Pro Gly Val Gln Arg Ser Pro Ala Glu Leu
740 745 750

Gln Gly Gly Gln Val Asp Leu Thr Gly Ala Thr Cys Pro Tyr Thr Leu
755 760 765

Ser Asn Met Thr Tyr Lys Glu Glu Asp Phe Glu Arg Leu Leu Arg Leu
770 775 780

Ser Asp Tyr Asn Val Gln Thr Ser Gln Gly Ala Ile Leu Gln Ala Leu

785

790

795

800

Arg Thr Ala Leu Lys His Arg Thr Leu Glu Ala Arg Pro Pro Arg Ala

805

810

815

Gln Thr

【図面の簡単な説明】

【図1】 正常人および乾癬患者に由来する皮膚組織サンプルにおけるGS21015遺伝子の発現レベルをiAFLP法により解析した結果を示した図。図中、「N01」、「N02」、「N03」、・・・および「N07」は正常人の組織サンプルを、「P01」、「P02」、「P03」、・・・および「P10」は乾癬患者の組織サンプルを各々表す。

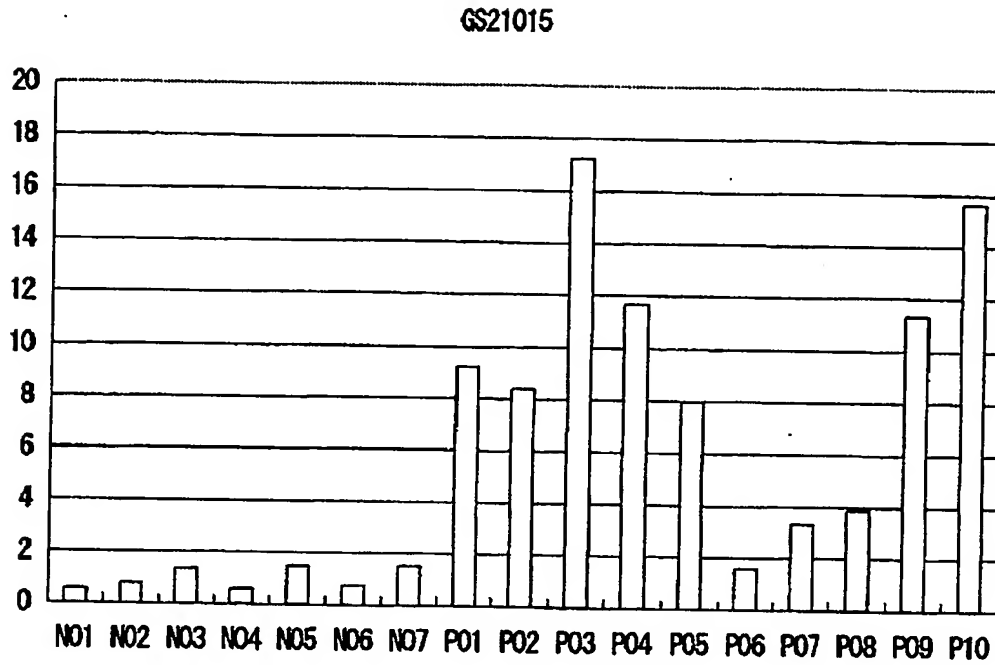
【図2】 GS21015のアミノ酸配列と、cPLA₂の分子種として従来から知られているcPLA₂α、cPLA₂β及びcPLA₂γのアミノ酸配列とを比較し、その相同性を示した図。

【図3】 GS21015のホスホリパーゼA₂活性（1-パルミトイル-2-アラキドニル-ホスファチジルコリンの2位のエステル結合を加水分解してアラキドン酸を遊離する活性）と反応時間との相関を示した図。

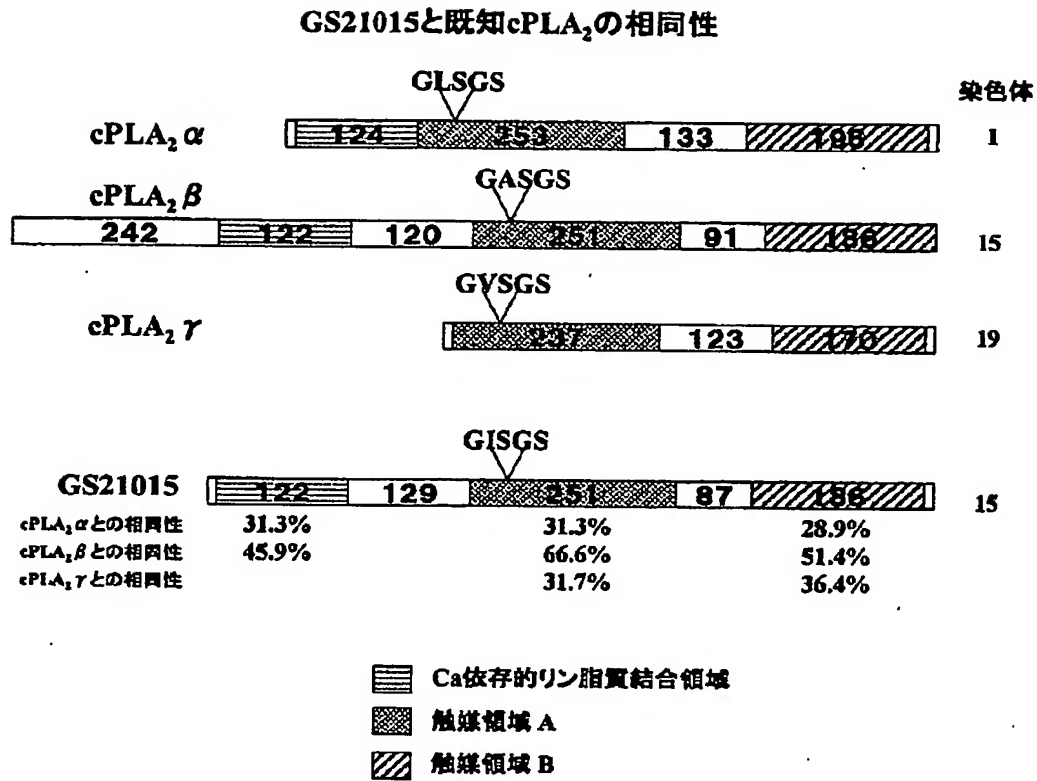
【書類名】

図面

【図 1】



【図 2】



【図3】

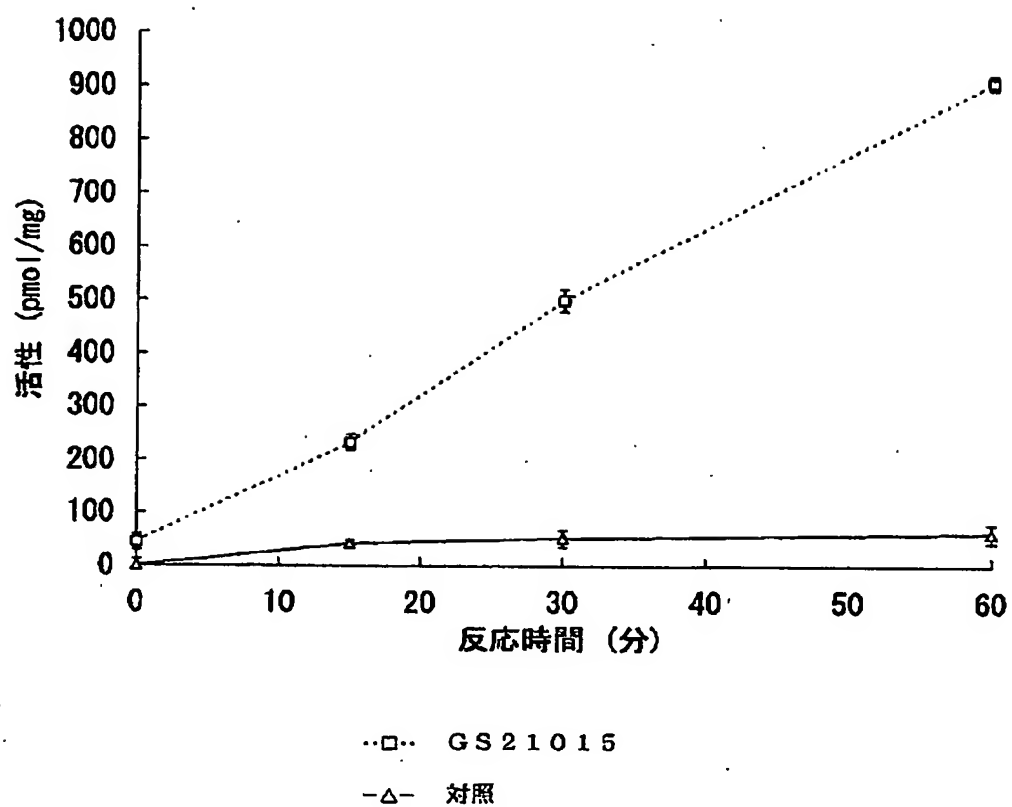


図3 GS21015のホスホリパーゼA₂活性

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 乾癬に関連する新規な型のホスホリパーゼ A_2 及びその遺伝子、ホスホリパーゼ A_2 阻害剤の特徴付け、同定又は選択を行うための新しい方法、並びに乾癬の診断や検査の新しい方法を提供する。

【解決手段】

以下の (a)、(b) 及び (c) から選択されるタンパク質、並びにそれをコードする遺伝子など。

(a) 配列番号 9 で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

(b) 配列番号 9 で示されるアミノ酸配列において 1 若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつホスホリパーゼ A_2 活性を有するタンパク質。

(c) 配列番号 8 で示される塩基配列と相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA にコードされ、かつホスホリパーゼ A_2 活性を有するタンパク質。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2002-008435
受付番号	50200052155
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成14年 1月18日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成14年 1月17日
-------	-------------

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000002956]

1. 変更年月日 1990年 9月20日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府大阪市中央区道修町3丁目2番10号

氏 名 田辺製薬株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.